

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 11/07/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

BRUNA LALLO DA SILVA

A INFLUÊNCIA DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS NAS
PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO ZnO

ARARAQUARA - SP

2017

BRUNA LALLO DA SILVA

**A INFLUÊNCIA DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS NAS
PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO ZnO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Rosemeire L. Rodrigues Pietro

ARARAQUARA - SP

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S586a Silva, Bruna Lallo da
A influência do tamanho das nanopartículas nas propriedades antimicrobianas do ZnO / Bruna Lallo da Silva. -- Araraquara, 2017.
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Leila Aparecida Chiavacci Favorin.
Coorientadora: Rosemeire L. Rodrigues Pietro.

1. Nanopartículas. 2. ZnO. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. *Escherichia coli*. 5. Concentração Inibitória Mínima. 6. Caracterização físico-química. I. Favorin, Leila Aparecida Chiavacci, orient. II. Pietro, Rosemeire L. Rodrigues, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

BRUNA LALLO DA SILVA

A influência do tamanho das nanopartículas nas propriedades antimicrobianas de ZnO

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 11 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA



LEILA APARECIDA CHIAVACCI FAVORIN



SANDRA HELENA PULCINELLI



TAIS MARIA BAUAB

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os mestres que passaram pela minha vida, ensinando a nunca desistir, amar e respeitar a profissão escolhida.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina." (Cora Coralina).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por sua infinita misericórdia, em proporcionar-me sabedoria necessária e paz para a conclusão do presente trabalho, mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha família, especialmente meus pais, **Solange** e **Sérgio**, por me apoiarem em todas as decisões, com amor e carinho, pela preocupação e principalmente, por sempre acreditarem em mim, minha avó **Dolores**, que mesmo sem muitos estudos, sempre é aquela que mais me ensina o significado da palavra sabedoria e determinação, meu irmão **Rafael**, cunhada **Daiane** e meus sobrinhos **Eduardo** e **Lorenzo** pelo apoio e momentos de descontração.

Gostaria de agradecer especialmente ao meu tio **Washington** (in memoriam) por sempre me motivar, com palavras de reconhecimento, apoio e incentivo, nunca esquecerei.

Ao **André**, pelo companheirismo, afeto, paciência e por acreditar nos meus sonhos.

A minha orientadora Prof. Dra. **Leila Aparecida Chiavacci Favorin** pelo auxílio e disponibilidade, transmitindo conhecimentos, com paciência e dedicação. Pela amizade e confiança durante esse trabalho.

A minha coorientadora Prof. Dra. **Rosemeire Linhari Rodrigues Pietro**, por todo apoio e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos do laboratório de Ciências dos Materiais Aplicados à Farmácia- **CMAF**, por todos os ensinamentos, companheirismo e incentivo. Pelos momentos de descontração e afeto, **Aline**, **Bruna**, **Eloísa**, **João**, **Mariluci**, **Marina**, **Nathália** e **Neima**. Gostaria de agradecer especialmente o **Bruno Leonardo Caetano** pelas correções e ideias ao longo do mestrado. Agradeço também aos amigos que fiz durante essa trajetória, **Bruna Castilho**, **Mariana Satto**, **Jéssica Bernegossi**, **Alice Hadad** e **Rodolfo Fini**.

Aos meus amigos e amigas por sempre me acompanharem em todos os momentos, ajudando no que fosse possível, e principalmente, entendendo os momentos de ausência, nunca deixando de lado a mão estendida e pelos momentos de diversão. Amo vocês, **Amanda**, **Tamires**, **Elisa**, **Karine**, **Natália** e **Mariane**.

Ao **Instituto de Química da UNESP/Araraquara**, em especial aos professores **Celso V. Santilli**, **Sandra Helena Pulcinelli** e **Rodrigo Costa Marques** pelo espaço cedido no laboratório para a realização desse trabalho e permissão da utilização de equipamentos para caracterização dos materiais.

Ao **LNLS** pelas medidas de SAXS, Dr **Florian Meneau** pelo suporte durante as medidas.

Ao **laboratório de biotecnologia** por possibilitarem espaço para realização dos testes de atividade antimicrobiana. Ao **Rodrigo** e **Vanessa** pelos conhecimentos transmitidos.

Ao apoio financeiro da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**.

À **Seção de Pós-graduação** e toda **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)**.

LISTA DE ABREVIACÕES

NP: nanopartículas

ZnO: óxido de zinco

GPTMS: (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane

LiOH: hidróxido de lítio

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

UV-Vis: espectroscopia na região do ultravioleta visível

SAXS: espalhamento de raios X a baixo ângulo

WAXS: espalhamento de raios X a alto ângulo

DRX: difração de raios X

EDS: Espectroscopia de raios X por dispersão de energia

DMSO: Dimetilsulfóxido

CIM: concentração inibitória mínima

CBM: concentração biocida mínima

ERO: espécies reativas de oxigênio

ZnO_3h: nanopartículas de ZnO sem modificador de superfície, sintetizadas em 3 horas com temperatura de 50°C

ZnO_24h: nanopartículas de ZnO sem modificador de superfície, sintetizadas em 24 horas com temperatura de 50°C

ZnO_GPTMS_3h: nanopartículas de ZnO com modificador de superfície (GPTMS), sintetizadas em 3 horas com temperatura de 50°C

ZnO_GPTMS_24h: nanopartículas de ZnO com modificador de superfície (GPTMS), sintetizadas em 24 horas com temperatura de 50°C

ZnO_3h_mufla: ZnO_3h submetido ao tratamento térmico na mufla

ZnO_24h_mufla: ZnO_24h submetido ao trabalho térmico na mufla

ZnO_GPTMS_3h_mufla: ZnO_GPTMS_3h submetido ao tratamento térmico na mufla

ZnO_GPTMS_24h_mufla: ZnO_GPTMS_24h submetido ao tratamento térmico na mufla

LPS: lipopolissacarídeo

PQ: Pontos quânticos

MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

HaCat: células cultivadas de queratinócitos humanos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camada de contorno de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	25
Figura 2. Esquema de preparação do precursor.....	34
Figura 3. Conversão da rezasurina.....	43
Figura 4. Conversão do MTT.....	47
Figura 5. Curvas de SAXS de ZnO em água, modificadas com GPTMS, sintetizadas em diferentes razões de hidrólise $r = [\text{OH}^-] / [\text{Zn}^{2+}]$	47
Figura 6. Curvas de SAXS de nanopartículas de ZnO, em água, modificadas com GPTMS. A1 e B1 mostram a região de Guinier para as amostras de razão de hidrólise 1.0 e 1.4, enquanto A2 e B2 mostram o fit do modelo de esfera.....	48
Figura 7. Curvas de SAXS de nanopartículas de ZnO, modificadas com GPTMS, submetidas a diferentes tempos de reação.....	49
Figura 8. Evolução das curvas de SAXS de NP de ZnO, sintetizadas à 50° por 180 minutos.....	51
Figura 9. Evolução temporal de $I(0)$ e R_g	52
Figura 10. Potencial zeta de nanopartículas de ZnO modificadas com GPTMS em função do pH e pontos isoelétricos (PI).....	54
Figura 11. Curva de SAXS de Nanopartículas de ZnO, modificadas com GPTMS e dispersas em água, com pH 7.0.....	55
Figura 12. Espectro de absorção UV-vis da suspensão coloidal de nanopartículas de ZnO ($r = [\text{OH}^-] / [\text{Zn}^{2+}] = 1.0$), sintetizadas à 50°C em diferentes tempos de reação.....	56
Figura 13. Espectros de absorção UV-Vis das suspensões coloidais de nanopartículas de ZnO em etanol sintetizadas com razão de hidrólise $[\text{OH}^-] / [\text{Zn}^{2+}] = 1.0$, em ultrassom.....	57
Figura 14. Espectros de absorção UV-Vis das suspensões coloidais de nanopartículas de ZnO em etanol sintetizadas com razão de hidrólise $[\text{OH}^-] / [\text{Zn}^{2+}] = 1.0$, em ultrassom à 50°C por 3 horas, seguidas de 21 horas em banho à 50°C com agitação magnética (ZnO_24h) e armazenadas em freezer (A) e em temperatura ambiente (B).....	58

Figura 15. Espectros de absorção UV-Vis de dispersões de nanopartículas de ZnO em água, modificadas com GPTMS, sintetizadas com razão de hidrólise $[OH]/Zn^{2+}=1.0$, em ultrassom à 50°C por 3 horas (ZnO_GPTMS_3h) e armazenadas à 5°C (A) e em temperatura ambiente (B).....	59
Figura 16. Espectros de absorção UV-Vis de dispersões de nanopartículas de ZnO em água, modificadas com GPTMS, sintetizadas com razão de hidrólise $[OH]/Zn^{2+}=1.0$, em ultrassom à 50°C por 3 horas seguidas de 21 horas em agitador magnético (ZnO_GPTMS_24h) e armazenadas à 5°C (A) e em temperatura ambiente (B).....	60
Figura 17. Análise termogravimétrica (TG) e tratamento térmico na mufla de nanopartículas de ZnO sintetizadas em 3 (A) e 24 (B) horas.....	64
Figura 18. Difratoformas de raios X das amostras ZnO_3h e ZnO_GPTMS_3h, comparado com ZnO aldrich.....	66
Figura 19. Difratoformas de raios X	67
Figura 20. Espalhamento de raio-X a alto ângulo.....	69
Figura 21. Evolução do espalhamento de raio-X a alto ângulo de acordo com o aumento da temperatura.....	70
Figura 22. MET das amostras sem modificador ZnO_3h (A) e modificadas ZnO_GPTMS_3h (B), com histograma mostrando o tamanho médio das nanopartículas.....	72
Figura 23. Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução da amostra ZnO_3h (A) e ZnO_GPTMS_3h (B).....	73
Figura 24. Espectroscopia de raios X por dispersão de energia de nanopartícula de ZnO, modificada com GPTMS.....	74
Figura 25. Exemplo de testes de atividade antimicrobiana realizados CIM (esquerda) e MBC (direita).....	75
Figura 26. Microscopia eletrônica de transmissão. <i>S.aureus</i>	82
Figura 27. Ensaios de citotoxicidade em célula HaCat.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de amostras utilizadas no trabalho.....	36
Tabela 2. Valores de R_g e R_{esfera}	50
Tabela 3. Raio das nanopartículas armazenadas em diferentes condições.....	62
Tabela 4. Tamanho médio dos cristalitos (D) obtidos a partir dos difratogramas de raios X.....	68
Tabela 5. Comparação dos tamanhos das NP de ZnO obtidos por diferentes técnicas.....	73
Tabela 6. CIM e CBM de NP de ZnO contra <i>S. aureus</i>	76
Tabela 7. CIM e CBM de NP de ZnO contra <i>E. coli</i>	77

RESUMO

Os óxidos metálicos, como óxido de zinco (ZnO) são utilizados como agentes antimicrobianos inorgânicos frente à grande diversidade de microrganismos. Devido ao tamanho reduzido, as nanopartículas (NP) de ZnO são promissoras para combater infecções, uma vez que a diminuição do tamanho da partícula pode resultar em melhor atividade antimicrobiana, pois por terem tamanho menor, as NP podem com maior facilidade penetrarem na membrana ou induzir a maiores produções de espécies reativas de oxigênio (ERO). O objetivo desse trabalho foi desenvolver suspensões e pós de nanopartículas de ZnO com tamanho e superfície controladas, com a finalidade de avaliar a influência do tamanho e da modificação de superfície na atividade antimicrobiana do ZnO frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e levedura *Cândida albicans*. As NP de ZnO foram preparadas pelo processo sol-gel de acordo com a metodologia proposta por Spanhel e Anderson (1991) com modificação da razão de hidrólise para controle do tamanho das NP seguida da adição de (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS), como modificador de superfície. Os nanomateriais obtidos foram caracterizados por diferentes técnicas: difração de raios X (DRX); espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-vis), espalhamento de raios X à baixo ângulo (SAXS); espalhamento de raios X a alto ângulo (WAXS); análise termogravimétrica (TG); microscopia eletrônica de transmissão (MET); Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) e potencial zeta. Com a técnica de DRX comprovamos a obtenção de NP de ZnO na fase wurtzita sendo possível o cálculo do tamanho do cristalito para as diferentes amostras utilizadas no estudo. Com a técnica de UV-vis identificamos o comprimento de onda limite, dessa forma foi possível calcular o raio médio das NP que foi de 2,9 nm e 5,4 nm para as NP submetidas a 3 e 24 horas de reação, respectivamente. Ainda através desta técnica foi possível provar alta estabilidade das NP. A temperatura de 600 °C foi selecionada por TG com finalidade de tratar termicamente as NP de ZnO na ordem de 5 nm resultando no aumento do seu tamanho, dessa forma, DRX foi utilizado para calcular o tamanho das NP, que passou a ser na ordem de 30 nm. De acordo com SAXS foi possível obter informações de tamanho, estrutura e crescimento das NP de ZnO, sendo que apresentaram em geral tamanho na ordem de 5 nm. O potencial zeta mostrou estabilidade das NP de ZnO dispersas em água a pH alcalino. A MET mostrou partículas relativamente esféricas com tamanho predominante de 5 nm. Assim, as diferentes técnicas utilizadas para avaliar o tamanho das NP apresentaram grande concordância entre si. Os dados de EDS provaram que as NP de ZnO modificadas apresentam alto grau de pureza. A avaliação da atividade antimicrobiana das NP de ZnO foi realizada pelos métodos de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida mínima (CFM), frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* e Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) em *Staphylococcus aureus*. As NP de ZnO mostraram melhor atividade frente a *Staphylococcus aureus*. Foram comparados os diferentes tamanhos das NP de ZnO em relação ao seu efeito antibacteriano sendo que as NP de ZnO de 5 nm foram mais eficazes para combater o crescimento microbiano do que as NP de 30 nm. A formação de buracos na estrutura de contorno de *S.aureus* foi evidenciada com a técnica de MEV após contato das bactérias com NP de ZnO. Os testes de citotoxicidade mostraram que as NP de ZnO não ocasionaram perda da viabilidade celular em linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat), dessa forma o material desenvolvido apresentou grande potencial para uso como antimicrobiano.

Palavras-chaves: Nanopartículas. ZnO. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*. Concentração Inibitória Mínima. Caracterização físico-química.

ABSTRACT

Metal oxides such as zinc oxide (ZnO) are used as inorganic antimicrobial agents against great diversity of microorganisms. Due the reduced size, ZnO nanoparticles (NP) are promising to combat infections, since the decrease in particle size may result in better antimicrobial activity, because of their smaller sizes, NP can more easily penetrate the membrane or induce a greater production of reactive oxygen species (ROS). The aim of this work was to develop suspensions and powders of ZnO nanoparticles with controlled size and surface, in order to evaluate the influence of size and surface modification on ZnO antimicrobial activity against bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and yeast *Candida albicans*. The ZnO NP were prepared by the sol-gel process according to the methodology proposed by Spanhel and Anderson (1991) with hydrolysis ratio modification for NP size control followed by the addition of (3-Glycidyloxypropyl) trimethoxysilane (GPTMS) as surface modifier. The nanomaterials obtained were characterized by different techniques: X-ray diffraction (XRD); Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-vis); small angle light scattering (SAXS); high angle light scattering (WAXS); thermogravimetric analysis (TG); Transmission electron microscopy (TEM); energy dispersive spectroscopy (EDS) and zeta potential. With the XRD technique, we verified the obtaining of ZnO NP in the wurtzite phase and it was possible to calculate the crystallite size for the different samples used in the study. With the UV-vis technique we identified the limit wavelength, so it was possible to calculate the mean radius of the NP that was of 2,9 nm and 5,4 nm for the NP submitted to 3 and 24 hours of reaction, respectively and through this technique it was possible to prove high NP stability. The temperature of 600 ° C was selected by TG with the purpose of thermally treating the ZnO NP size in order about of 5 nm resulting in the increase of its size, thus, XRD was used to calculate the size of NP, which became in the order of 30 nm. According to SAXS, it was possible to obtain information on size, structure and growth of ZnO NP, with size of 5 nm in general. The zeta potential showed stability of the ZnO NP dispersed in water at alkaline pH. The MET showed spherical particles with a predominant size of 5 nm. Thus, the different techniques used to evaluate the NP size presented great agreement among themselves. The EDS data proved that the modified ZnO NP are high purity. The antimicrobial activity was performed by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (CBM) and Minimum Fungicide Concentration (CFM) methods against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* and Scanning Electron Microscopy (SEM) in *Staphylococcus aureus*. The ZnO NP showed better activity against *Staphylococcus aureus*. The different sizes of ZnO NP were compared to their antibacterial effect, and the 5nm ZnO NP 30nm ZnO NP. The formation of holes in the contour structure of *S. aureus* was evidenced with SEM technique after contact of the bacteria with ZnO NP. Cytotoxicity tests showed that ZnO NP did not cause loss of cell viability in human keratinocyte cell line (HaCat), so the developed material presented great potential for use as an antimicrobial.

Keywords: Nanoparticles. ZnO. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*. Minimal Inhibitory Concentration. Physico-chemical characterization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1. Síntese de nanopartículas de ZnO via sol-gel	18
3.2. Mecanismos de atividade antimicrobiana de NP de ZnO	21
3.3. A influência dos parâmetros físico-químicos de nanopartículas de óxido de zinco em relação à atividade antimicrobiana.....	27
3.4. Modificação de superfície das nanopartículas de ZnO	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Materiais e equipamentos.....	31
4.2. Síntese das NP de ZnO.....	33
4.2.1. Preparação do precursor de oxiacetato de zinco	33
4.2.2. Suspensão coloidal de nanopartículas de ZnO	34
4.2.3. Modificação da superfície de nanopartículas de ZnO.....	35
4.3. Métodos de caracterização das nanopartículas de ZnO	37
4.3.1. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	37
4.3.2. Potencial zeta	38
4.3.3. Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível (UV-Vis)	38
4.3.4. Análise Termogravimétrica.....	39
4.3.5. Difração de raios X	40
4.3.6. Espalhamento de raios X a alto ângulo (WAXS).....	40
4.3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	40
4.3.8. Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS).....	40
4.4. Ensaio de atividade antimicrobiana.....	41
4.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	41
4.4.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM).....	43
4.4.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.4.4 Ensaio de citotoxicidade.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 Caracterização físico-química	46
5.1.1. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	46
5.1.2. Estudo do crescimento de ZnO por SAXS	49
5.1.3. Potencial zeta	51

5.1.4 Espectroscopia na região UV-vis	55
5.1.5. Análise Termogravimétrica e tratamento térmico.....	63
5.1.6 Difração de raios X (DRX)	64
5.1.7. Espalhamento de Raio-X a alto ângulo (WAXS).....	68
5.1.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	70
5.1.8. Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS).....	73
5.2. Avaliação do potencial antimicrobiano	74
5.2.1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida e Fungicida mínima	74
5.2.2. Microscopia eletrônica de Varredura	81
5.2.3. Avaliação do potencial citotóxico das nanopartículas de ZnO.....	81
6. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

O aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos comerciais é uma preocupação mundial. Por esse motivo, a resistência microbiana é abordada com o intuito de desenvolver novos sistemas capazes de combater infecções. O uso indevido de antibióticos resultou na seleção de cepas bacterianas resistentes (LEUNG et al., 2012) uma vez que as bactérias podem gerar respostas adaptativas por meio de mutações genéticas ou transferências horizontais de elementos de resistência de bactéria para bactéria (DEREWACZ et al., 2013). Da mesma forma, o uso prolongado e intenso de antifúngicos levou à diminuição da sensibilidade aos antifúngicos utilizados para combater infecções, bem como ao aumento de cepas resistentes (BADDIE; ALBORZI, 2011).

Em muitas infecções há a presença de cepas resistentes a praticamente todos os antibióticos utilizados para combatê-las. Por exemplo, bactéria *Staphylococcus aureus*, que comumente está presente em infecções pós cirúrgicas em tecidos moles e pneumonia (JESLINE et al., 2014), pode ser resistente até mesmo à Meticilina e outros betalactâmicos (RAI, 2013).

É crescente o aumento da virulência de bactérias comensais, principalmente a *Escherichia coli*, e como consequência, aumentou-se a fixação, invasão e persistência celular na mucosa intestinal (SARTOR, 2008). Nesse sentido, as bactérias intestinais podem acarretar inflamações intestinais crônicas (SWISINSKI et al., 2002).

Na maioria das vezes os fungos são encontrados como saprófitos e não acarretam danos à saúde humana, em contrapartida, algumas micoses oportunistas causam infecções em indivíduos com resistência imunológica baixa, como é o caso da *Candida albicans*, presente em vaginites e em infecções orais (FAKHROUEIAN et al., 2014). A candidíase sistêmica é uma infecção invasiva que acomete pacientes pós-cirúrgicos internados por tempo prolongado durante a neutropenia ou após realização de transplantes, podendo causar a morte em pacientes imunocomprometidos (BADDIE; ALBORZI, 2011).

Entre as alternativas para combater infecções, encontra-se o uso de agentes antimicrobianos inorgânicos, já que estes possuem algumas vantagens em relação aos antimicrobianos orgânicos, como menor toxicidade, longa durabilidade, menor resistência microbiana e boa seletividade (RANA et al., 2006; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2016).

O óxido de zinco (ZnO) é utilizado em diferentes áreas para controlar o crescimento microbiano (FIROUZABADI et al., 2014) de grande diversidade de microrganismos, tais como: *Staphylococcus aureus* (RAGHUPATHI et al., 2011; RAI, 2013; MANOHARAN et al., 2015), *Escherichia coli* (IRELAND et al., 1993; LIU et al., 2009; LEUNG et al., 2012) e *Candida albicans* (JANAKI et al., 2015; PASQUET et al., 2015).

Embora o ZnO seja utilizado como agente antimicrobiano em produtos farmacêuticos e cosméticos, a diminuição do tamanho da partícula para ordem nanométrica pode causar mudanças em suas propriedades químicas, elétricas e óticas, o que torna capaz de promover novas aplicações (AHMAD; ZHU, 2011).

Os avanços em nanotecnologia permitiram obter partículas de distintas formas e tamanhos e com grande área de superfície em relação ao volume, possibilitando a interação com células microbianas, o que acarretou no desenvolvimento de novos agentes biocidas (DURAIRAJ et al., 2015). Dessa forma, o uso de NP pode ser uma alternativa para minimizar os casos de resistência microbiana e promover menor toxicidade (RAI, 2013). Além disso, quando o tamanho do ZnO é reduzido para nanoescala, sua atividade antimicrobiana pode ser aumentada (SIRELKHATIM et al.; 2015).

Entre as propriedades das NP de ZnO que podem influenciar no seu efeito antimicrobiano, destaca-se o tamanho da partícula. Dessa forma, alguns estudos abordaram esse tema como o desenvolvido por Raghupathi e colaboradores, (2011), mostrando que as partículas que apresentaram menor tamanho (12 nm) possuíram melhor atividade em relação às maiores. Pasquet e colaboradores (2014) também avaliaram a atividade antimicrobiana de NP de ZnO dependente do tamanho da partícula, sendo que os resultados também mostraram que a menor partícula de 14,7 nm foi mais efetiva para combater o crescimento microbiano do que as maiores. É importante ressaltar que nesses estudos não foram avaliados a atividade antimicrobiana de NP de ZnO menores de 10 nm.

Entre as formas de sintetizar NP de ZnO, o método sol-gel, desenvolvido por Spanhel e Anderson, 1991 é promissor, uma vez que permite o uso de temperaturas amenas e dá origem a pequenos cristalitos. No entanto, essa síntese, resulta em NP de ZnO instáveis em água, o que limita seu uso biológico. Nos últimos anos, como alternativa para melhorar a estabilidade e permitir a dispersão em meios aquosos das NP de ZnO, tem-se usado modificadores de superfície (GHASEMI et al., 2009; GULIA; KAKKAR, 2013). Vale ressaltar que há grande importância no uso dos modificadores de superfície em NP de ZnO

para a aplicação como agente antimicrobiano, uma vez que os testes de atividade antimicrobiana são realizados comumente em meios aquosos ou de cultura celular (SIRELKHATIM et al.; 2015).

Entre os modificadores de superfície utilizados, os organosilanos destacam-se, pois possuem baixa toxicidade e ligam-se de forma covalente à superfície hidroxilada das NP, criando uma barreira de proteção do núcleo contra a água, permitindo também a dispersão das NP de ZnO em meios aquosos. Jana e colaboradores, (2007) revestiram diferentes NP (Au, Ag, Fe₃O₄, and ZnS-CdSe) com modificadores de superfície a base de silanos, obtendo resultados positivos quanto a estabilidade em água das NP produzidas. Aboulaich e colaboradores, (2012) realizaram a funcionalização de pontos quânticos (PQ) de ZnO com (poly)aminotrimethoxysilanos. Os resultados mostraram que os PQ desenvolvidos apresentaram boa biocompatibilidade, alto rendimento quântico e fotoluminescência em água, além disso, os PQ de ZnO revestidos com silanos tiveram boa estabilidade coloidal, mantendo suas propriedades óticas por 14 dias enquanto dispersos em água. (JANA et al., 2007; ABOULAICH et al., 2012).

Pesquisadores vem explorado o potencial de aplicar modificadores de superfície como os organosilanos em NP de ZnO para avaliar o efeito antimicrobiano, como abordado por Čepin e colaboradores, (2015), que avaliaram diferentes modificadores de superfície a base de silanos na atividade antibacteriana de NP de ZnO frente à *E.coli* e *S.aureus* mostrando resultados positivos em todos os modificadores testados. As NP de ZnO modificadas inibiram completamente o crescimento bacteriano na concentração de 0.125 g/L, apresentando inclusive melhoria na atividade antimicrobiana em relação às NP de ZnO sem modificação.

O uso do (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS) foi abordado em tese de doutorado do nosso grupo de pesquisa. Nesse trabalho, o GPTMS foi aplicado como modificador de superfície de PQ de ZnO com o intuito de aplica-los para o diagnóstico e vetorização de fármacos. Os resultados apresentados mostraram que a modificação de superfície pelo GPTMS permitiu a dispersão dos PQ de ZnO em água, melhorando a sua estabilidade e aumentando o rendimento fotoluminescente o que beneficia a utilização dos PQ de ZnO em diversas aplicações, como por exemplo, o uso destes como sondas biológicas (RISSI et al., 2017).

Para a finalidade na atividade antimicrobiana de NP de ZnO, o uso do GPTMS foi encontrado em um único trabalho, desenvolvido por Farouk e colaboradores, (2014), o qual

abordou a sua aplicação em tecidos com propriedade antimicrobiana para indústrias têxteis. Os resultados mostraram que as NP de ZnO com distribuição de tamanho de 30-60 nm possuíram melhor atividade antimicrobiana contra *E. coli* do que as NP de ZnO de tamanhos maiores.

O presente trabalho mostra alta relevância, pois obteve NP de ZnO de diferentes tamanhos, inclusive menores que 10 nm, com finalidade de estudar o efeito do tamanho e da modificação de superfície com GPTMS em relação à atividade antimicrobiana desse material. Além disso, a modificação de superfície é altamente importante para promover estabilidade em água das NP de ZnO. A influência do tamanho das NP de ZnO em suas propriedades antimicrobianas bem como o uso do GPTMS como modificador de superfície foi reportado previamente por pesquisadores (FAROUK et al., 2014), no entanto não há estudos que correlacionam o efeito antimicrobiano de NP de ZnO modificadas com GPTMS menores de 30 nm e embora haja trabalhos avaliando a influência do tamanho das NP de ZnO em sua atividade antimicrobiana, estudos que correlacionam esse aspecto para NP de ZnO menores de 10 nm são escassos.

6. CONCLUSÃO

As nanopartículas de ZnO foram sintetizadas em temperaturas amenas pelo método sol-gel e modificadas com GPTMS, tornando-as hidrofílicas, possibilitando a dispersão em água. Pode-se comprovar a obtenção de NP de ZnO através das técnicas de UV-vis e DRX, sendo que o ZnO se encontra em sua fase hexagonal com estrutura wurtzita. A análise termogravimétrica permitiu a seleção da temperatura de 600°C para tratar termicamente as nanopartículas com e sem GPTMS.

O tamanho das NP de ZnO foi avaliado por diferentes técnicas, as quais apresentaram grande concordância entre si. A espectroscopia na região do UV-vis possibilitou o cálculo do raio das NP pelo modelo matemático proposto por Brus. Com a técnica de SAXS, foi possível obter informações de tamanho, estrutura e crescimento das NP de ZnO. De acordo com os dados apresentados por DRX e de espalhamento de raios X a alto ângulo WAXS foi possível calcular o tamanho dos cristalitos pela fórmula de Scherrer. A microscopia eletrônica de

transmissão (MET) mostrou partículas com morfologias relativamente esféricas e possibilitou avaliar a distribuição de tamanho das nanopartículas de ZnO.

O tempo de reação da síntese sol-gel não acarretou diferenças significativas no tamanho da partícula, no entanto, as nanopartículas tratadas termicamente, com temperatura de 600°C, apresentaram acentuado crescimento em relação àquelas que não foram tratadas termicamente, por exemplo, de acordo com o DRX, ZnO_GPTMS_3h apresentou tamanho na ordem de 5,2 nm e ZnO_3h de 4,5 nm, enquanto ZnO_GPTMS_3h_mufla de 21,20 nm e ZnO_3h_mufla de 33,93 nm.

As NP de ZnO são mais eficazes em combater *S.aureus* do que *E.coli*, sendo que a atividade antibacteriana em *S.aureus* está relacionada com danos à estrutura celular por meio de “buracos” formados nas estruturas de contorno, com lise celular e extravasamento de conteúdos celulares.

As NP menores apresentaram melhor atividade antibacteriana do que as NP de ZnO de tamanhos maiores. As NP maiores tiveram efeito bacteriostático, enquanto as menores, bactericida, o que comprova que a excelência na atividade de NP de ZnO em *S. aureus* e *E.coli* foi altamente dependente do tamanho da partícula, inclusive mudando o mecanismo de ação.

As NP de ZnO sintetizadas na ordem de 5 nm e modificadas com GPTMS apresentam alto potencial de aplicação como agente antibacteriano, já que pequenas concentrações tiveram efeito bactericida em *S.aureus*, com danos à sua estrutura celular. Além disso, não foi observado perda da viabilidade celular em linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat), o que evidencia que as NP de ZnO apresentam toxicidade para bactérias e não para a linhagem de células humanas testada. A modificação de superfície de NP de ZnO pelo uso do GPTMS torna sua aplicação biológica muito mais fácil e sua excelente atividade antibacteriana, somada com a toxicidade seletiva em bactérias, aumenta ainda mais o potencial de uso das NP de ZnO como agente antibacteriano.

REFERÊNCIAS

ABOULAICH, A. et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of (poly) aminoalkoxysilanes-functionalized ZnO quantum dots. **Nanotechnology**, v. 23, n. 33, p. 335101, 2012. ISSN 0957-4484.

ADAMS, L. K.; LYON, D.Y.; ALVAREZ, P.JJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. **Water Research**, v. 40, n. 19, p. 3527-3532, 2006.

AHMAD, M.; ZHU, J. ZnO based advanced functional nanostructures: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 599-614, 2011.

APPLEROT, G.; LELLOUCH, J.; PERKAS, N.; NITZAN, Y.; GEDANKEN, A.; BANIN, E. ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility. **RSC Advances**, v. 2, n. 6, p. 2314-2321, 2012.

ARAKHA, M.; SALEEM, M.; MALLICK, B.; JHA, S. The effects of interfacial potential on antimicrobial propensity of ZnO nanoparticle. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

ASOK, A.; GANDHI, M. N.; KULKARNI, A. R. Enhanced visible photoluminescence in ZnO quantum dots by promotion of oxygen vacancy formation. **Nanoscale**, v. 4, n. 16, p. 4943-4946, 2012.

BADIEE, P.; ALBORZI, A. Susceptibility of clinical Candida species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: A five year study. **Iranian journal of microbiology**, v. 3, n. 4, p. 183, 2011.

BAEK, Y.-W.; AN, Y.-J. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Streptococcus aureus. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 8, p. 1603-1608, 2011. ISSN 0048-9697.

BRAR, S. K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 4-17, 2011. ISSN 0165-9936.

BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M.; FIÉVET, F. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. **Nano Letters**, v. 6, n. 4, p. 866-870, 2006. ISSN 1530-6984.

BRIVOIS, V. et al. In situ and simultaneous nanostructural and spectroscopic studies of ZnO nanoparticle and Zn-HDS formations from hydrolysis of ethanolic zinc acetate solutions induced by water. **Journal of Sol-gel Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 25-36, 2006. ISSN 0928-0707.

BROUNER, H. "Testing for chemical toxicity using bacteria: An undergraduate laboratory experiment." **Journal of Chemical Education**, v. 68, p. 695-697, 1991.

BRUNNER, T. J. et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 14, p. 4374-4381, 2006. ISSN 0013-936X.

BRUS, L. Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 90, n. 12, p. 2555-2560, 1986. ISSN 0022-3654.

CABEEN, M. T.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell shape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 601-610, 2005. ISSN 1740-1526.

CAETANO, B. L. **Formação e crescimento de nanopartículas de óxido de zinco via sol-gel**. 2010. 165f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CAETANO, B. L.; SANTILLI, C.V.; MENEAU, F.; BRIOS, V.; PULCINELLI, S.H. In situ and simultaneous UV–vis/SAXS and UV–vis/XAFS time-resolved monitoring of ZnO quantum dots formation and growth. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 11, p. 4404-4412, 2011. ISSN 1932-7447.

ČEPIN, M.; JOVANOVSKEY, V.; PODLOGAR, M.; OREL, Z.C. Amino- and ionic liquid-functionalised nanocrystalline ZnO via silane anchoring—an antimicrobial synergy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 6, p. 1059-1067, 2015.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, tenth edition. CLSI document M07-A10 2015, CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standards**. Approved standard, third Edition. CLSI Document M27-A3. CLSI, 2008, Wayne, Pennsylvania, USA.

DEREWACZ, D. K.; GOODWIN, C.R.; MCNEES, C.R.; MCLEAN, J.A.; BACHMANN, B.O. Antimicrobial drug resistance affects broad changes in metabolomic phenotype in addition to secondary metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 6, p. 2336-2341, 2013. ISSN 0027-8424.

DONG, Y.-D.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International journal of pharmaceuticals**, v. 417, n. 1, p. 101-111, 2011. ISSN 0378-5173.

DUAN, J.; HUANG, X.; WANG, E. PEG-assisted synthesis of ZnO nanotubes. **Materials Letters**, v. 60, n. 15, p. 1918-1921, 2006. ISSN 0167-577X.

DURAIRAJ, B.; MUTHU, S.; XAVIER, T. Antimicrobial activity of *Aspergillus niger* synthesized titanium dioxide nanoparticles. **Advances in Applied Science Research**, v. 6, n. 1, p. 45-48, 2015.

DUTTA, R. K., SHARMA, P.K.; BHARGAVA, R.; KUMAR, N.; PANDEU, A.C. Differential susceptibility of *Escherichia coli* cells toward transition metal-doped and matrix-embedded ZnO nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 16, p. 5594-5599, 2010. ISSN 1520-6106.

EFERO, A. L. Interband absorption of light in a semiconductor sphere. **Soviet Physics Semiconductors-Ussr**, v. 16, n. 7, p. 772-775, 1982. ISSN 0038-5700.

FAKHROUEIAN, Z. DEHSHIRI, A.M.; KATOUIZIAN, F.; ESMAEILZADEH, P. . In vitro cytotoxic effects of modified zinc oxide quantum dots on breast cancer cell lines (MCF7), colon cancer cell lines (HT29) and various fungi. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 7, p. 1-14, 2014. ISSN 1388-0764.

FAROUK, A.; MOUSSA, S.; ULBRICHT, M.; SCHOLLMAYER, E.; TEXTOR, T. ZnO-modified hybrid polymers as an antibacterial finish for textiles. **Textile Research Journal**, v. 84, n. 1, p. 40-51, 2014. ISSN 0040-5175.

FIROUZABADI, F. B.; NOORI, M.; EDALATPANAH, Y.; MIRHOSSEINI, M. ZnO nanoparticle suspensions containing citric acid as antimicrobial to control *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in mango juice. **Food Control**, v. 42, p. 310-314, 2014. ISSN 0956-7135.

GHASEMI, Y.; PEYMANI, P.; AFIFI, S. Quantum dot: magic nanoparticle for imaging, detection and targeting. **Acta Bio Medica Atenei Parmensis**, v. 80, n. 2, p. 156-165, 2009. ISSN 0392-4203.

GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small angle scattering of X-rays**. J. Wiley & Sons, New York: Wiley, 1955.

GULIA, S.; KAKKAR, R. ZnO quantum dots for biomedical applications. **Advanced Materials Letters**, v. 4, n. 12, p. 876-887, 2013.

GUO, B.-L. et al. The antibacterial activity of Ta-doped ZnO nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2015. ISSN 1931-7573.

HAIPOUR, M. J. et al. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 499-511, 2012. ISSN 0167-7799.

HE, L.; LIU, Y.; MUSTAPHA, A.; LIN, M.. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. **Microbiological Research**, v. 166, n. 3, p. 207-215, 2011. ISSN 0944-5013.

HEINLAAN, M.; IVASK, A.; DUBOURQUIER, H.V.; KAHRU, A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, v. 71, n. 7, p. 1308-1316, 2008. ISSN 0045-6535.

HEYES, C. D.; KOBITSKI, A. Y.; BREUS, V. V.; NIENHAUS, G. U. Effect of the shell on the blinking statistics of core-shell quantum dots: A single-particle fluorescence study. **Physical Review B**, v. 75, n. 12, p. 125431, 2007.

HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, p. 171-180, 1995. ISSN 0100-4042.

HIROTA, K., SUGIMOTO, M., KATO, M., TSUKAGOSHI, K., TANIGAWA, T., SUGIMOTO, H. Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions. **Ceramics International**, v. 36, n. 2, p. 497-506, 2010.

HSU, A. et al. Is the effect of surface modifying molecules on antibacterial activity universal for a given material? **Nanoscale**, v. 6, n. 17, p. 10323-10331, 2014.

IRELAND, J. C.; KLOSTERMANN, P.; RICE, E.W.; CLARK, R.M. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1668-1670, 1993. ISSN 0099-2240.

ISNAENI; KIM, K. H.; NGUYEN, D. L.; LIM, H.; NGA, P. T.; CHO, Y.-H. Shell layer dependence of photoblinking in CdSe/ZnSe/ZnS quantum dots. **Applied Physics Letters**, v. 98, n. 1, p. 012109-3, 2011.

JANA, N. R.; EARHART, C.; YING, J. Y. Synthesis of water-soluble and functionalized nanoparticles by silica coating. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 21, p. 5074-5082, 2007. ISSN 0897-4756.

JANAKI, A. C.; SAILATHA, E.; GUNASEKARAN, S. Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 144, p. 17-22, 2015. ISSN 1386-1425.

JESLINE, A.; JOHN, N.P.; NARAYANAN, P.M.; VANI, C.; MURUGAN, S. Antimicrobial activity of zinc and titanium dioxide nanoparticles against biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Applied Nanoscience**, v. 5, n. 2, p. 157-162, 2014. ISSN 2190-5509.

KAIRYTE, K.; KADYS, A.; LUKSIENE, Z. Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 128, p. 78-84, 2013. ISSN 1011-1344.

KOHLBRECHER, J.; BRESSLER, I. **SASfit**. Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland. 0.94.1 2014.

LEUNG, Y. H. et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles with a modified surface under ambient illumination. **Nanotechnology**, v. 23, n. 47, p. 475703, 2012. ISSN 0957-4484.

LI, X.; WANG, G.; LI, X. Surface modification of nano-SiO₂ particles using polyaniline. **Surface and Coatings Technology**, v. 197, n. 1, p. 56-60, 2005. ISSN 0257-8972.

LI, M.; ZHU, L.; LIN, D. Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 5, p. 1977-1983, 2011.

LI, Y.; ZHANG, W.; NIU, J.; CHEN, Y. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. **ACS Nano**, v. 6, n. 6, p. 5164-5173, 2012. ISSN 1936-0851.

LIN, P.-C.; LIN, S.; WANG, P.C.; SRIDHAR, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 711-726, 2014. ISSN 0734-9750.

LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; GEDANKEN, A.; LUBART, R. Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury. **Nanotechnology**, v. 22, n. 10, p. 105101, 2011. ISSN 0957-4484.

LIU, Y.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; HU, Z.Q.; LIN, M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1193-1201, 2009. ISSN 1365-2672.

MANAIA, E. B. **Pontos Quânticos à base de óxido de zinco (ZnO) para aplicações em bioimagem de nanocarreadores lipídicos.** 2016. 178f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

MANAIA, E. B. et al. Liquid crystalline formulations containing modified surface TiO₂ nanoparticles obtained by sol-gel process. **Journal of sol-gel Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 251-257, 2012. ISSN 0928-0707.

MANOHARAN, C.; PAVITHRA, G.; DHANAPANDIAN, S.; SHANTHI, B. Properties of spray pyrolysed ZnO: Sn thin films and their antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 141, p. 292-299, 2015. ISSN 1386-1425.

MANZOOR, U.; ZAHRA, F.T.; RAFIQUE, S.; MOIN, M.T.; MUJAHID, M. Effect of synthesis temperature, nucleation time, and postsynthesis heat treatment of ZnO nanoparticles and its sensing properties. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. 9, 2015. ISSN 1687-4110.

MONTEJANO, H.A., GERVALDO, M., BERTOLOTTI, S.G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, n. 64, p. 117-124, 2005.

MOUSSODIA, R.-O.; BALAN, L.; MERLIN, C.; MUSTIN, C.; SCHNEIDER, R. Biocompatible and stable ZnO quantum dots generated by functionalization with siloxane-core PAMAM dendrons. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 1147-1155, 2010.

NEDELIJKOVIC, J. M.; PATEL, R.C.; KAUFMAN, P.; JOYCE-PRUDENC.; O-LEARY, N. Synthesis and optical properties of quantum-sized metal sulfide particles in aqueous solution. **Journal of Chemical Education**, v. 70, n. 4, p. 342, 1993.

PADAM, E.; BIBI, E. ITO, M.; KRULWICH, T.A. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1717, n. 2, p. 67-88, 2005.

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, 2016.

PATHAKOTI, K.; HWANG, H.M.; XU, H.; AQUILAR, Z.P.; WANG, A. In vitro cytotoxicity of CdSe/ZnS quantum dots with different surface coatings to human keratinocytes HaCaT cells. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 1, p. 163-171, 2013. ISSN 1001-0742.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M., GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 46. n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PASQUET, J.; CHEVALIER, Y.; COUVAL, E.; BOUVIER, D.; BOLZINGER, M.A. Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: Interactions with common formulation ingredients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, n. 1, p. 88-95, 2015. ISSN 0378-5173.

PASQUET, et al. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 460, n. 1, p. 92-100, 2014. ISSN 0378-5173.

RAGHUPATHI, K. R.; KOODALI, R. T.; MANNA, A. C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. **Langmuir**, v. 27, n. 7, p. 4020-4028, 2011. ISSN 0743-7463.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 44-48, 2013. ISSN 0009-6725.

RANA, S.; RAWAT, J.; SORENSON, M.M.; MISRA, R.D.K. Antimicrobial function of Nd³⁺-doped anatase titania-coated nickel ferrite composite nanoparticles: a biomaterial system. **Acta Biomaterialia**, v. 2, n. 4, p. 421-432, 2006. ISSN 1742-7061.

RAOUFI, D.; RAOUFI, T. The effect of heat treatment on the physical properties of sol-gel derived ZnO thin films. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 11, p. 5812-5817, 2009. ISSN 0169-4332.

RISS, T. L. et al. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**, 2016.

RISSI, N. C. **Micelas poliméricas contendo pontos quânticos a base de óxido de Zinco com superfície modificada para futura aplicação em diagnóstico e vetorização de fármacos**. 2016. 121f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

RISSI, N. C.; HAMMER, P.; CHIAVACCI, L. A. Surface modification of ZnO quantum dots by organosilanes and oleic acid with enhanced luminescence for potential biological application. **Materials Research Express**, v. 4, n. 1, p. 015027, 2017. ISSN 2053-1591.

SARTOR, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577-594, 2008. ISSN 0016-5085.

SAWAI, J. et al. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 521-522, 1998. ISSN 0922-338X.

SCHERRER, P. H. et al. The solar oscillations investigation-Michelson Doppler imager. **Solar Physics**, v. 162, n. 1-2, p. 129-188, 1995. ISSN 0038-0938.

SCHNABLEGGER, H.; SINGH, Y. The SAXS guide: getting acquainted with the principles. **Anton Paar GmbH**, v. 2, 2013.

SCOTT, J. R.; BARNETT, T. C. Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 397-423, 2006. ISSN 0066-4227.

STANKOVIĆ, A.; DIMITRIJEVIĆ, S.; USKOKOVIĆ, D. Influence of size scale and morphology on antibacterial properties of ZnO powders hydrothermally synthesized using different surface stabilizing agents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 21-28, 2013. ISSN 0927-7765.

SEVEN, O.; DINDAR, B.; AYDEMIR, S.; METIN, D.; OZINEL, M.A.; ICLI, S. Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO₂, ZnO and Sahara desert dust. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 165, n. 1, p. 103-107, 2004. ISSN 1010-6030.

SHARMA, N.; JANDAİK, S.; KUMAR, S. Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências AHEAD**, v. 88, n. 3, supl. p. 1689-1698, 2016.

SHINDE, V. V.; DALAVI, D.S.; MALI, S.S.; HONG, C.K.; KIM, J.H.; PATIL, P.S. Surfactant free microwave assisted synthesis of ZnO microspheres: Study of their antibacterial activity. **Applied Surface Science**, v. 307, p. 495-502, 2014. ISSN 0169-4332.

SHOEB, M. et al. ROS-dependent anticandidal activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by using egg albumen as a biotemplate. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 4, n. 3, p. 035015, 2013. ISSN 2043-6262.

SIRELKHATIM, A. et al. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 3, p. 219-242, 2015. ISSN 2311-6706.

SPANHEL, L.; ANDERSON, M. A. Semiconductor clusters in the sol-gel process: quantized aggregation, gelation, and crystal growth in concentrated zinc oxide colloids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 8, p. 2826-2833, 1991. ISSN 0002-7863.

SWIDSINSKI, A. et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 44-54, 2002. ISSN 0016-5085.

TALEBIAN, N.; AMININEZHAD, S. M.; DOUDI, M. Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 66-73, 2013. ISSN 1011-1344.

TAYEL, A. A. et al. Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 2, p. 211-218, 2011. ISSN 1745-4565.

TOKUMOTO, M. S.; BRIOS, V.; SANTILLI, C.V.; PULCINELLI, S.H. Preparation of ZnO nanoparticles: structural study of the molecular precursor. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 26, n. 1-3, p. 547-551, 2003. ISSN 0928-0707.

TOKUMOTO, M. S.; PULCINELLI, S.H.; SANTILLI, C.V.; BRIOS, V. Catalysis and temperature dependence on the formation of ZnO nanoparticles and of zinc acetate derivatives prepared by the sol-gel route. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 2, p. 568-574, 2003. ISSN 1520-6106.

TOKUMOTO, M. S.; PULCINELLI, S.H.; SANTILLI, C.V.; CRAIEVICH, A.F. SAXS study of the kinetics of formation of ZnO colloidal suspensions. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 247, n. 1, p. 176-182, 1999. ISSN 0022-3093.

VISWANATHA, R.; AMENITSCH, H.; SARMA, D. D. Growth kinetics of ZnO nanocrystals: a few surprises. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 14, p. 4470-4475, 2007. ISSN 0002-7863.

XIONG, H.-M. Photoluminescent ZnO nanoparticles modified by polymers. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 4251-4262, 2010.

YAMAMOTO, O.; LIDA, Y. Antifungal characteristics of spherical carbon materials with zinc oxide. **Journal of Ceramic Society of Japan**, v. 111, n. 1296, p. 614-616, 2003.

ZHANG, Y., WU, L. J., TASHIRO, S. I., ONODERA, S., & IKEJIMA, T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 1, p. 83-89, 2004.

ZHANG, L.; JIANG, Y.; POVERY, M.; YORK, D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, n. 3, p. 479-489, 2007.